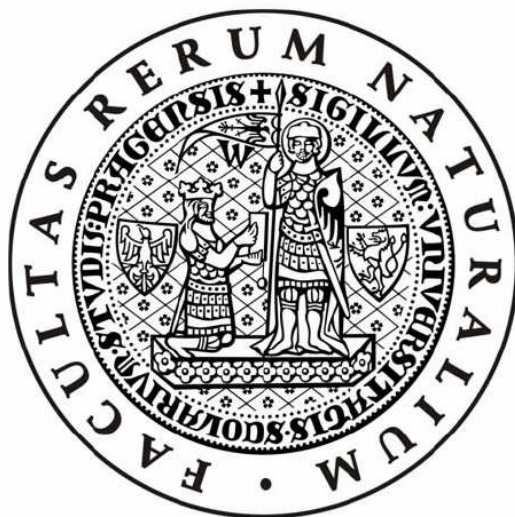


Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra parazitologie



Mezihostitelská specifita miracidíí motolic

Intermediate host specificity of trematode miracidia

Bakalářská práce

Lucie Náhunková

Školitel: Prof. RNDr. Petr Horák, Ph.D.

Praha 2010

Ráda bych poděkovala svému školiteli panu profesoru Prof. RNDr. Petru Horákovi, Ph.D. za trpělivost a cenné rady. Dále srdečně děkuji rodině a všem svým blízkým přátelům za podporu v průběhu mého studia.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a že zde cituji veškerou použitou literaturu.

V Praze dne 11. 8. 2010

Lucie Náhunková

Obsah

Abstrakt	5
1. Úvod	7
2. Charakteristika motolic	8
2.1 Morfologie motolic	8
2.2 Životní cyklus motolic	9
2.3 Charakteristika miracidia	10
3. Vztah miracidia k meziphostiteli.....	13
3.1 Líhnutí miracidíí	13
3.2 Hledání habitatu meziphostitele.....	13
3.3 Náhodné hledání meziphostitele v daném habitatu	15
3.4 Orientace a specifické rozpoznání meziphostitele.....	16
3.4.1 Charakteristika SCW, MAGs a dalších atraktantů.....	16
3.4.2. Chemoorientace miracidíí	18
3.4.3 Meziphostitelská specifita miracidíí motolic	20
3.4.3.1 Geografická variabilita miracidíí motolic	22
3.5 Chování miracidíí po kontaktu s meziphostitelem	25
3.5.1 Penetrace	25
3.6 Ochrana meziphostitele.....	26
4. Závěr	28
5. Použitá literatura	29

Abstrakt

Motolice patří do skupiny parazitických bezobratlých živočichů kmene Platyhelminthes. Mají velmi složitý životní cyklus. U většiny motolic nalezneme první larvální stadium - miracidium. Hlavním cílem miracidia je najít vhodného meziphostitele – měkkýše, a to pomocí senzorických orgánů reagujících na různé chemické a fyzikální podněty. Na základě určitých signálů z vnějšího prostředí se spouští orientační chování miracidia, které se pohybuje buď prostřednictvím taxie nebo kineze. Nejdříve se miracidium orientuje pomocí fyzikálních podnětů, mezi které patří hlavně světlo, tma a gravitační síla. Dalšími signály mohou být teplota nebo zemský magnetismus. Následně rozpoznává specifické chemické látky vylučované plži, které patří do skupiny glykoproteinů. Tyto sloučeniny byly nazvány „miracidia attracting glycoproteins“ (MAGs). V přítomnosti těchto atraktantů (MAGs) u miracidí pozorujeme časté změny směru pohybu tzv. „rate of change of direction“ (RCD), a pokud koncentrace glykoproteinu klesá, miracidia se otáčejí zpět, tzv. „turnback swimming“.

Miracidium každého druhu motolice má odlišnou meziphostitelskou specifitu a někdy záleží i na geografickém umístění daného druhu motolice.

Chování, specifita a orientace miracidia jsou velmi důležité pro vývoj parazita. Pokud najde specifického meziphostitele, zvyšuje se tím šance úspěšně nakazit definitivního hostitele a rozmnožit se. Motolice způsobují mnoho závažných onemocnění u lidí i zvířat jako je např. schistosomóza. Zjištěním specifických meziphostitelů a atraktantů miracidí jednotlivých druhů motolic můžeme přerušit jejich životní cyklus, např. saturací chemoreceptorů miracidí. Zabráníme-li parazitovi se vyvíjet v měkkýši, snížíme tím rozšíření parazita a počet onemocnění člověka i zvířat.

Klíčová slova: motolice, miracidium, chemická orientace, fototaxe, geotaxe, glykoproteiny, parazit, plž, druhová specifita

Abstract

Trematodes belong to a group of parasitic invertebrate animals of the phylum Platyhelminthes. They have a complicated life cycle. Members of Trematoda have the first larval stage - miracidium. Its primary goal is to find a compatible intermediate host - a mollusc - by use of sensory organs which can respond to various chemical and physical stimuli. Certain signals invoke specific behavior in the outer environment and then miracidium move by taxis or kinesis. They first respond to environmental signals such as light, dark and gravity. The other stimuli are temperature or magnetic force. Then the miracidium locates its host by recognition of highly specific chemical molecules produced by snails. These compounds belong to a group of glycoproteins which are called "miracidia attracting glycoproteins" (MAGs). When the attractant (MAGs) is present, we often observe rate of change of direction (RCD) and if the concentration of glycoproteins is dropping, then we can observe „turnback swimming” of miracidia.

Miracidium has different species specificity towards intermediate host and sometimes species specificity depends on geographic distribution of particular snail hosts of trematodes.

Chemoorientation, specificity and behavior of miracidia are very important for trematode development. When the flukes find compatible intermediate host which represents an important step for subsequent invasion of definitive host and reproduction of parasite. Trematodes cause many human and animal diseases, for example schistosomiasis. We can disrupt the life cycle of trematodes by recognition of specific intermediate hosts and miracidia-attracting molecules, for example by decreasing of population of intermediate hosts through desiccation of their natural biotopes or by saturation of chemoreceptors of miracidia. If we prevent parasite to develop in mollusc, then we can influence expansion of infection and number of human and animal diseases.

Key words: Trematoda, miracidium, chemoorientation, phototaxis, geotaxis, glycoproteins, parasite, snail, species specificity

1. Úvod

Motolice mají velmi komplikovaný životní cyklus, který se vyznačuje nepřímým vývojem zahrnující jednoho až tři meziphostitele. Jsou více než 200 miliónů let výhradně parazité měkkýšů. Způsobují různá onemocnění zvířat i člověka, jedním z nejrozšířenějších je schistosomóza. Tímto onemocněním je na světě infikováno kolem 200 miliónů lidí a ohroženo je až 800 miliónů lidí (Steinmann a kol. 2006). Toto je také důvod, proč se mnoho vědeckých pracovišť soustřeďuje na studium schistosom.

Miracidium je volně žijící larvální stadium motolic. Ve vnějším prostředí se orientuje na základě fyzikálních a chemických signálů, které pomáhají infekčnímu stadiu motolice najít kompatibilního meziphostitele. Pro motolice je charakteristická meziphostitelská specifita a může se v rámci jednoho druhu i geograficky lišit.

Ve své bakalářské práci jsem se pokusila shrnout dosavadní poznatky o meziphostitelské specifitě a chování miracidí při vyhledávání meziphostitelů. Především na které podněty miracidia reagují a jak se pomocí nich orientují.

2. Charakteristika motolic

Motolice (Trematoda) jsou skupinou parazitických bezobratlých živočichů. Zařazujeme je do kmene Platyhelminthes, podkmene Neodermata, kam patří společně s třídami Monogenea a Cestoda. Třída Trematoda zahrnuje dvě podtřídy: Aspidogastrea a Digenea. Ve své práci se zaměřuji na první larvální stadium podtřídy Digenea, do níž je řazena většina druhů motolic.

2.1 Morfologie motolic

Motolice jsou bilaterálně souměrné. Nejčastěji mají dorzoventrálně zploštělé tělo, převážně oválného tvaru. Dospělé motolice mohou dosahovat velikosti až několik metrů, běžně ale měří od několika desetin milimetrů do několika centimetrů.

U většiny motolic nalezneme na ventrální straně těla dvě přísavky - ústní a břišní, které mají přichycovací funkci. U některých zástupců břišní přísavka (acetabulum) chybí. Může být nahrazena útvarem v podobě velkého přichytného disku (řád Aspidogastrea), řadou přísavek (řád Stichocotylida) nebo žlázových papil (dospělci rodu *Notocotylus*).

Tělo motolice pokrývá syncytium (neodermis), které vzniká při přeměně miracidia na další ontogenetické stadium. Neodermis má několik funkcí. Je důležitá pro přenos živin a trávení, ale také chrání organismus před nepříznivými vlivy vnějšího prostředí. Mnoho motolic má také trny nacházející se na povrchu těla, které jsou pokryté vrstvou vnější cytoplazmatické membrány.

Prostory mezi orgány vyplňují parenchymatické buňky, které mají zároveň i opornou funkci. Svalová soustava je složená ze tří vrstev. Vnější vrstvu tvoří okružní svalovina, pod ní se nachází podélná svalovina a nejspodnější vrstva se nazývá šikmá svalovina. Trávicí soustava je dobře vyvinutá, ale živiny mohou také přijímat tegumentem. Soustava začíná ústním otvorem, okolo kterého je většinou ústní přísavka. Ústa též slouží k vyvrhování. Střevo má různé tvary např. jednu nebo dvě větve, které mohou být slepé či se v zadní části těla spojuvat. Ze střeva u některých motolic vybíhají postranní slepé výběžky. Vylučovací soustava se skládá z různého počtu protonefridií. Plaménkové buňky filtrují tělní tekutinu z parenchymového prostoru a filtrát je odváděn soustavou kanálků do exkrečního měchýřku, ze kterého se dostává na povrch těla exkrečním pórem. Nervová soustava je orthogonálního typu. V přední části těla ji tvoří párové ganglion, ze kterého vybíhají krátké nervové provazce k přednímu konci těla a delší provazce propojené příčnými komisurami k zadní části těla. Motolice nemají vyvinutý anální otvor, dýchací ani oběhový systém.

2.2 Životní cyklus motolic

Motolice mají komplikovaný vývojový cyklus. Tyto parazity můžeme nacházet v různých částech těla hostitele, hlavně v trávicí a nervové soustavě, v krevním řečišti a dalších dutinách či tkáních. Většina dospělých motolic jsou hermafrodité, ale některé druhy, např. schistosomy jsou gonochoristé. U motolic se většinou setkáváme s dvouhostitelským, případně s tří či čtyřhostitelským cyklem. V dospělosti nejčastěji žijí uvnitř těla obratlovců, jen výjimečně jsou ektoparaziti.

Životní cykly motolic jsou různě složité. Vajíčka jsou produkována v těle definitivního hostitele pohlavně dospělými motolicemi. Opouští tělo hostitele a larva se vyvíjí ve vnějším prostředí. Vývoj vajíčka ovlivňuje teplota okolního prostředí a obsah kyslíku. Proces líhnutí závisí na intenzitě světla a osmotických změnách prostředí. Většinou dochází k otevření vaječného víčka nebo k prasknutí stěny vajíčka. U některých druhů motolic může být již ve vajíčku, které odchází z definitivního hostitele, vyvinutá larva prvního stadia. Výjimečně je ve vajíčku embryo mateřské sporocysty (např. rod *Notocotylus*).

Miracidium aktivně vyhledává meziphostitele pomocí chemických signálů a následně do něho aktivně proniká pomocí proteolytických enzymů, které jsou produkovány apikálními žlázkami. První larvální stadium motolic většinou napadá měkkýše, převážně různé druhy plžů. Výjimkou jsou mořští mnohoštětinatci, kteří jsou první meziphostitelé u některých druhů čeledi Sanguinicolidae. V některých případech se první meziphostitel nakazí pozřením vajíčka.

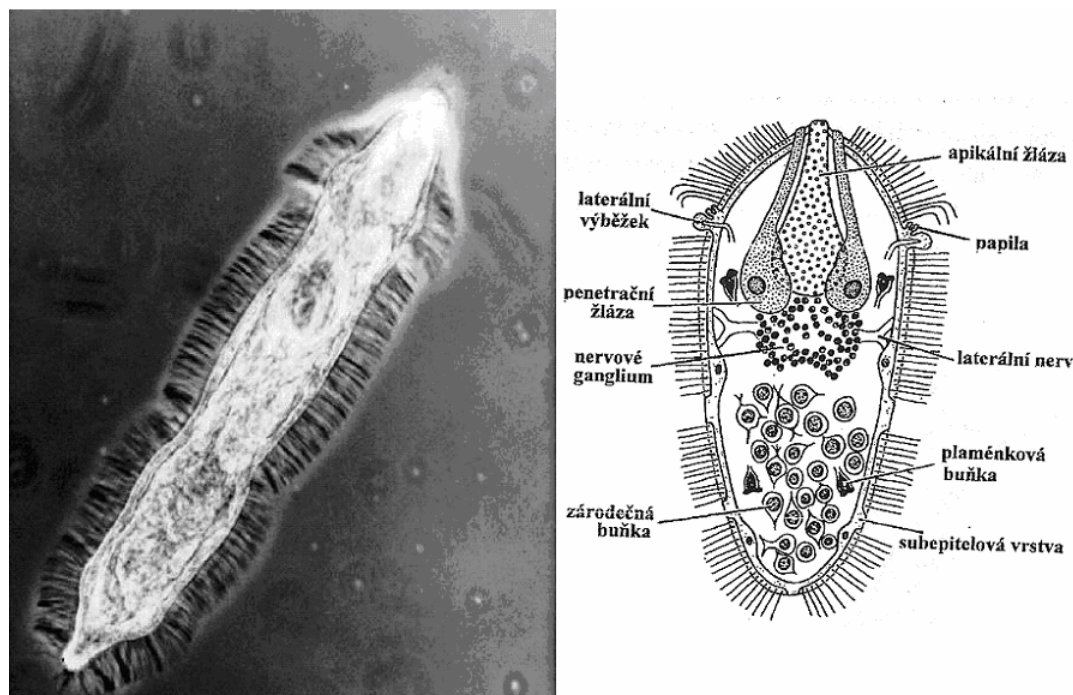
Uvnitř meziphostitele se miracidium přemění na mateřskou sporocystu a z místa penetrace migruje tkáněmi hostitele. Ze sporocysty vznikají redie nebo dceřiné sporocysty, což záleží na druhu motolice. V těle redie i dceřiné sporocysty nalezneme mnoho zárodečných buněk, ze kterých vznikají asexuálním množením další dceřiné redie a dceřiné sporocysty. Následně po několika generacích dochází k produkci dalšího larválního stadia – cercárie, která aktivně či pasivně (např. ve slizové kouli) opouští tělo meziphostitele. Nyní se vývoj může ubírat několika směry. U dvouhostitelského cyklu mohou cercárie zůstat uvnitř sporocysty a vyvíjí se do stadia metacercárie. Ta je společně s meziphostitelským měkkýšem pozřena definitivním hostitelem (např. čeleď Leucochloridiidae). Některé cercárie se uvolňují z plže a přisedají ve vnějším prostředí na vegetaci a odhazují ocásek. Pomocí cystogenních žlázek vytvoří cystu. Vznikne tzv. metacercárie, která se společně s potravou dostane do těla definitivního hostitele (např. čeleď Fasciolidae). Nejčastěji cercárie aktivně vyhledávají hostitele pomocí chemických signálů a teploty. Přichycení a vstup jim usnadňují penetrační

žlázy obsahující různé enzymy. Při vstupu do hostitele odhazují glykokalyx. Po penetraci se přemění na další stadium, které je často pojmenované podle druhu či čeledi motolic, např. schistosomuly u čeledi Schistosomatidae nebo diplostomuly u druhu *Diplostomum spathaceum*. V případě tříhostitelských cyklů cercárie pronikají do dalšího meziphostitele buď aktivně nebo jsou pozřeny. Až ve druhém meziphostiteli vznikne metacercárie a poté je pozřena definitivním hostitelem (např. čeleď Diplostomatidae). U některých životních cyklů nacházíme další stadium – mezocercárie, které se vyskytuje mezi stadii cercárie a metacercárie a vzniká ve druhém meziphostiteli z cercárie. Má dobře vyvinuté penetrační žlázy usnadňující migraci tělem meziphostitele. Metacercárie se vyvíjí ve třetím meziphostiteli nebo v definitivním hostiteli, kde následně vzniká dospělá motolice (např. čeleď Strigeidae).

2.3 Charakteristika miracidia

Miracidium je první larvální stadium motolic, které většinou žije volně ve vodním prostředí. U některých druhů se vyvine jen uvnitř vajíčka a do meziphostitele se dostane jeho pozřením (např. *Dicrocoelium dendriticum*). Miracidium je velké 10-350 μm a žije pouze několik hodin (obr. 1).

Obr. 1: Morfologie miracidí motolic



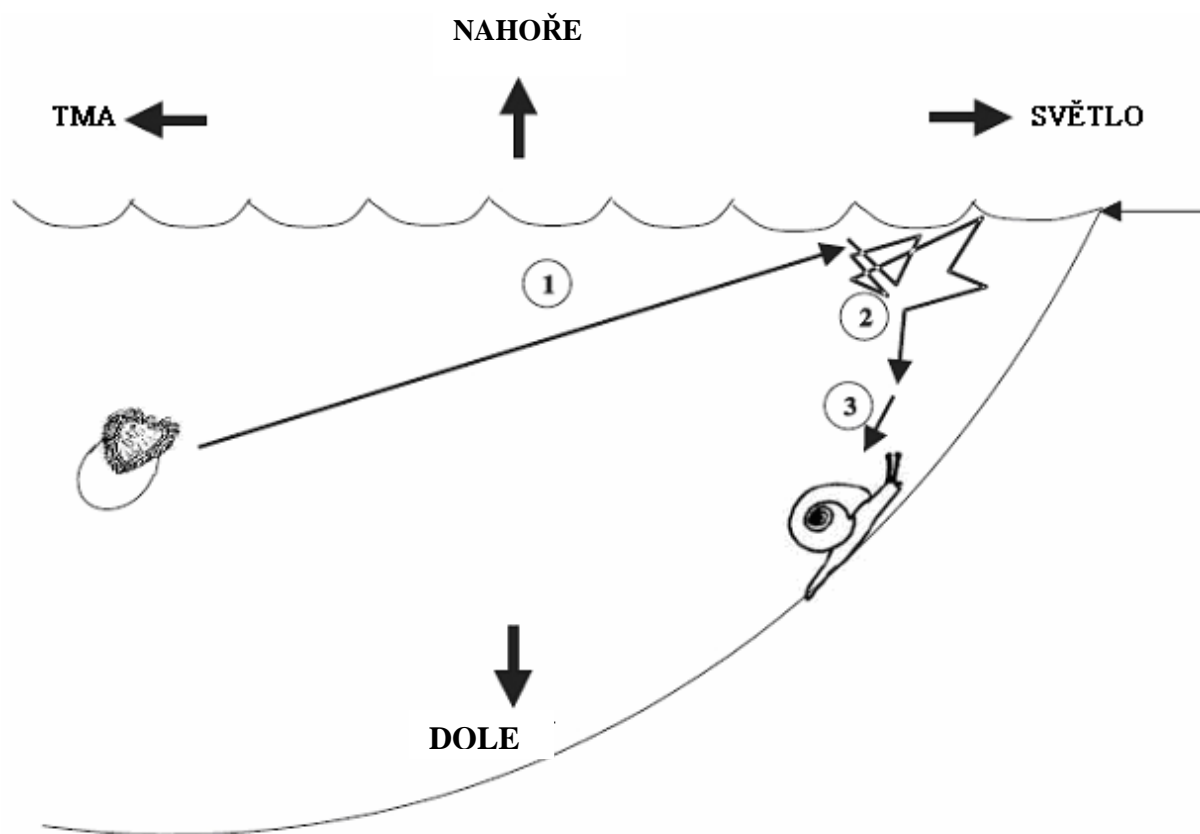
Nalevo: Fotografie *Schistosoma mansoni* pod mikroskopem s fázovým kontrastem (upraveno podle Pan 1980)

Napravo: Vnitřní organizace těla miracidia *Schistosomatium douthitti* (Horák a Scholz 1999 a Smyth 1994)

V přední části těla má apikální papilu (terebatorium). U některých druhů miracidí nalezneme stylet, který má tvar šípku a napomáhá k snazšímu proniknutí do meziphostitele. Tělo pokrývají ciliární buňky, které slouží k pohybu. Mezi nimi jsou mezibuněčné valy. V parenchymu jsou zárodečné buňky, ze kterých vzniká v měkkýši nepohlavním dělením další stadium. Všichni jedinci, kteří vznikají z jednoho miracidia, nesou stejnou genetickou informaci.

Po vylíhnutí z vajíčka se u miracidí spouští specifické chování, které se mění v průběhu jejich života. Můžeme ho rozdělit na několik fází (obr. 2).

Obr. 2: Chování miracidí při hledání meziphostitele



Proces hledání meziphostitele můžeme rozdělit na několik fází: (1) Hledání habitatu meziphostitele pomocí světla a gravitace, (2) náhodné hledání meziphostitele v habitatu, (3) specifické rozpoznání plže a chemoorientace směrem k hostiteli (upraveno podle Sukhdeo a Sukhdeo 2004).

Během svého krátkého života musí miracidium najít vhodného meziphostitele a penetrovat do něj. Meziphostitelem bývá nejčastěji plž. Snaží se rozpoznat svého hostitele co

nejdříve. Nepřijímá potravu a využívá energii ze svých zásob. Další vývoj motolice může pokračovat jen ve vhodném mezihostiteli, což jsou pro motolice specifické druhy měkkýšů. Pokud ho včas nenajde nebo vnikne do druhově nevhodného měkkýše, nastává smrt a vývojový cyklus parazita zde končí.

3. Vztah miracidia k meziphostiteli

Miracidium má splnit během svého krátkého života jediný důležitý úkol, a to vyhledat vhodný druh měkkýše, který poskytuje nejlepší podmínky pro jeho další vývoj a penetrovat do něj. Život většiny miracidíí můžeme rozdělit do několika fází. Nejprve se první larvální stadium vylíhne z vajíčka, pak hledá místo výskytu specifického měkkýše (orientuje se pomocí vnějších signálů a chemických stimulů vyloučených meziphostiteli), poté nalezne plže, vnikne do něj a přemění se na mateřskou sporocystu.

3.1 Líhnutí miracidíí

Miracidia se líhnou několika způsoby. Většinou se vylíhnou ve vnějším prostředí z vajíčka poté, co opustí definitivního hostitele. U druhu *Dicrocoelium dendriticum* vajíčka musí požřít měkkýš, aby došlo k líhnutí miracidia. Někdy už vylíhlé první larvální stadium opouští tělo definitivního hostitele, například u druhu *Trichobilharzia regenti* se miracidia líhnou v nosní dutině kachen (Blažová a Horák 2005). Způsob vylučování vajíček dospělými jedinci motolic i líhnutí larev prvního stadia má vliv na následné úspěšné nakažení meziphostitele. U druhu *Schistosoma haematobium* je vylučování vajíček rytmické, opouští definitivního hostitele v určitou dobu, která zvyšuje úspěšnost nákazy meziphostitele. Kolem poledne, kdy je největší pravděpodobnost přítomnosti definitivního hostitele (člověka) ve vodním prostředí, se vyloučí nejvíce vajíček (Scott a Stimel 1956, cit. dle Doehring a kol. 1983; McMahon 1976).

Na líhnutí vajíčka má také vliv teplota okolního prostředí a obsah kyslíku. Otevření vajíčka či jeho prasknutí vyvolá změna osmotického tlaku prostředí, intenzity světla a teploty. Například u motolice druhu *Schistosoma mansoni* je pro líhnutí miracidia z vajíčka pravděpodobně nejsilnějším podnětem změna osmotického tlaku (Kassim a Gilbertson 1976).

3.2 Hledání habitatu meziphostitele

Během přibližně prvních tří hodin života proplouvá miracidium poměrně rozsáhlé území, přičemž podle signálů z vnějšího prostředí se buď snaží vzdálit od místa líhnutí, což může zvýšit počet infikovaných meziphostitelů, anebo se pohybuje v místě líhnutí. Pohybuje se poměrně rychle a nemění směr. Rychlost pohybu miracidia je přibližně 2,5 cm/s (Chernin 1970; Mason a Fripp 1976; Plorin a Gilbertson 1981). Většinou nereaguje přímo na látky vylučované ze svého meziphostitele, ale rozpoznává jeho místo výskytu (habitat)

prostřednictvím světla (např. mělčina) či tmy (např. dno rybníka) a gravitační síly (Campbell a Todd 1955; Takahashi a kol. 1961, cit. dle Hertel a kol. 2006; Sukhdeo a Sukhdeo 2004). Miracidia mohou reagovat na světlo a gravitaci pozitivně nebo negativně, přičemž jejich reakce závisí na obvyklém místě výskytu jejich meziphostitele. Miracidia druhů *Fasciola hepatica*, *Echinostoma trivolis*, *Echinostoma caproni*, *S. mansoni* a *Trichobilharzia szidati* reagují pozitivně na světlo a negativně na gravitaci. Miracidia *F. hepatica* a *T. szidati* nalezneme nejčastěji blízko břehů rybníka, kde žijí jejich meziphostitelé *Galba truncatula* a *Lymnaea stagnalis*. Meziphostitelem prvního larválního stadia druhů *E. caproni* a *S. mansoni* je *Biomphalaria glabrata*. K setkání miracidia *E. trivolis* s *Helisoma trivolis* dochází ve světlých oblastech mělčin rybníků a potoků, kde plž hledá potravu (Chernin a Dunavan 1962; Mason a Fripp 1976; Behrens a Nollen 1992; Nollen 1994; Sukhdeo a Sukhdeo 2004; Hertel a kol. 2006). Naopak *Philophthalmus lucknowensis*, *Philophthalmus megalurus* a *Philophthalmus gralli* pozitivně odpovídají na gravitaci a negativně na světlo. Meziphostitelem *P. lucknowensis* je plž *Melanoides tuberculata*, který žije na dně rybníka. Miracidium *P. megalurus* vyhledává plže *Pleurocera acuta*. Mělká dna potoků obývá *Tarebia granifera*, která je meziphostitelem *P. gralli* (Keshavarz-Valian a Nollen 1980; Nollen 1990; Sukhdeo a Sukhdeo 2004). Stejně se chovají i miracidia *S. haematobium*, to znamená, že vykazují negativní fototaxi a pozitivní geotaxi (Shiff 1969). *Echinostoma paraensei* pozitivně odpovídá na světlo, ale nereaguje na gravitační sílu (Meece a Nollen 1996). U miracidíí druhu *P. gralli* byla ještě sledována pozitivní magnetotaxe, kdy se miracidia vystavená magnetickému poli o síle 3×10^{-4} až 2×10^{-2} T (Tesla, jednotka magnetické indukce) orientovala na sever (Stabrowski a Nollen 1985). Zatím ale není znám přesný mechanismus, jak se miracidia dokáží orientovat pomocí gravitační síly a magnetického pole.

U některých druhů je zjištěno, že jeden z faktorů (světlo nebo gravitace) ovlivňuje chování miracidíí více než druhý. Například u *E. trivolis* a *E. caproni* je pozitivní fototaxe dominantní nad negativní geotaxí (Behrens a Nollen 1992; Nollen 1994). U druhů *P. gralli* a *S. mansoni* má silnější vliv na chování miracidia gravitační síla než světlo (Keshavarz-Valian a Nollen 1980; Nollen 1990).

Miracidia mají na povrchu těla fotoreceptory a některé druhy i oční skvrny, kterými pravděpodobně reagují na světlo. Přesný mechanismus orientace na světlo, ani způsob pohybu, jakým na světlo reagují, však zatím není objasněn. Mason a Fripp (1976) použitím fotografické metody sledovali dráhy miracidíí jako série bodů. Zjistili, že miracidia *S. mansoni* se většinou shlukují na místě s nejvyšší světelnou intenzitou. Jsou-li blíže podnětu (světlu), začnou snižovat svou rychlost pohybu. Tomuto pohybu říkáme orthokineze.

Miracidium *F. hepatica* významně zvyšuje počet změn směru pohybu, tzv. „rate of turning“ s intenzitou světla. Tento pohyb Wilson a Denison (1970, cit. dle Sukhdeo a Sukhdeo 2004) označili jako klinokinezi. Miracidia dokáží rozeznat intenzitu světla ze dvou různých zdrojů. U druhů *F. hepatica*, *Schistosomatium douthitti*, *S. mansoni* a *Bunodera mediovitellata* byla zjištěna vlnová délka světla, na kterou reagují. Všechny jmenované motolice reagují maximálně na světlo v rozmezí 500-550 nm, které proniká nejhlouběji v čisté vodě (Haas 2001; Sukhdeo a Sukhdeo 2004).

Na úspěšnost miracidí při hledání meziphostitele může mít velký vliv zákal vodního prostředí, síla vodního proudu, přírodní překážky, teplota nebo magnetické pole Země. Například vodní proud vyšší než 15 cm/s brání miracidím druhu *S. haematobium* najít *Bulinus globosus* na dně rybníku. U druhu *S. mansoni* nedokáže miracidium penetrovat do svého meziphostitele *B. glabrata* při proudu vody vyšším než 105 cm/s (Webbe 1966, cit. dle Sukhdeo a Sukhdeo 2004; Shiff 1968).

Miracidia *S. haematobium* a *S. japonicum* vykazují sezónně rozdílné preference habitatu v závislosti na teplotě, protože díky jejím změnám se mění místo výskytu meziphostitele *B. globosus* a *Oncomelania hupensis* (Takahashi a kol. 1961, cit. dle Kalbe a kol. 1996; Shiff 1974).

Teplota okolního prostředí též může měnit odpovědi schistosom na světlo a gravitaci (Shiff 1974; Mason a Fripp 1976). V průběhu léta při teplotě 18-27°C miracidia druhu *S. haematobium* infikují většinou svého meziphostitele *B. globosus* na dně nebo u hladiny, která je zastíněná. Naopak v zimě, kdy teplota klesne na 13-18°C, se miracidia musí přemístit od studeného dna k teplejší hladině. V průběhu roku se mění u miracidí odpověď na světlo z negativní na pozitivní vlivem klesající teploty prostředí. Pokud by miracidium *S. haematobium* nezměnilo svou orientaci, s vysokou pravděpodobností by včas nenašlo vhodného meziphostitele (Shiff 1974; Haas 2001). Miracidia *S. japonicum* se chovají stejně jako *S. haematobium*. Změní svou fotopozitivní orientaci na negativní se zvyšující se teplotou nebo světelnou intenzitou, protože se mění místo výskytu jejich meziphostitele *Oncomelania hupensis* (Takahashi a kol. 1961, cit. dle Kalbe a kol. 1996; Haas a kol. 1991).

3.3 Náhodné hledání meziphostitele v daném habitatu

Po 1-3 hodinách svého života změní miracidia své chování a více se soustředí na hledání svého meziphostitele (Saladin 1979; Sukhdeo a Sukhdeo 2004). Přejít z fáze vyhledávání přirozeného výskytu meziphostitele na náhodné hledání meziphostitele v daném

habitatů není příliš objasněn. Obvykle je tato fáze většinou autorů ignorována. U miracidí *S. mansoni* se v této fázi vyhledávání meziphostitele snižuje rychlost jejich pohybu a zvyšuje se počet změn směru. Náhodně prozkoumávají blízké okolí, a pokud se nesetkají se svým kompatibilním měkkýšem, unaví se a uhynou (Mason a Fripp 1976; Sukhdeo a Sukhdeo 2004).

3.4 Orientace a specifické rozpoznání meziphostitele

Miracidia se v této fázi zaměřují na signály meziphostitelů v daném habitatu. Chemické látky atrahující larvy motolic jsou kolem plže nepravidelně rozloženy. Náhodné rozmístění produktů měkkýšů je způsobeno prouděním ve vodě, a proto se nevytvoří gradient chemických látek vyloučených plží. Motolice se pohybuje chemokinezí, což vede k nahromadění miracidí v nejbližším okolí meziphostitele nebo miracidium dokáže určit směr koncentračního gradientu chemické látky, a pohybuje se chemotaxí (Haas a kol. 1991, 1995a).

Ve fázi specifického rozpoznávání a orientace směrem k meziphostiteli miracidia snižují svou lineární rychlost, ale zvyšuje se množství změn ve směru jejich pohybu. Hledají svého hostitelského plže, dokud nespotřebují všechny své energetické zásoby (Moné a Fournier 1994; Sukhdeo a Sukhdeo 2004).

3.4.1 Charakteristika SCW, MAGs a dalších atraktantů

Použitím různých metod byla snaha identifikovat látky atraktivní pro miracidia. Většina prací se soustředila na miracidia *S. mansoni*, ale i přesto jejich výsledky byly velmi sporné (Haas 2001). Molekuly obsažené v hlenu plžů nejvíce přitahují pozornost miracidí (MacInnis 1965; Chernin 1970; Shiff a Kriel 1970). Vyskytují se v nejbližším okolí měkkýše v různých koncentracích, tzv. „snail-conditioned water“ (SCW).

Zástupci jednoho druhu plže mají relativně stálé chemické složení makromolekul SCW, ale druhově se SCW liší. Například SCW z různých druhů měkkýšů obsahuje v podstatě stejné aminokyseliny, ale v odlišných koncentracích. Reakce miracidí motolic na jednotlivé aminokyseliny závisí na jejich koncentraci a meziphostitelské specifitě miracidia (Prechel a kol. 1976). SCW je složeno z aminokyselin, hořčnatých iontů, krátkých řetězců mastných kyselin, N-acetylneuraminové kyseliny, amoniaku, glutathionu a dalších chemických látek. Z aminokyselin je nejvíce zastoupen glycin, serin a alanin (Prechel a kol. 1976). Atraktivní část SCW je pro miracidia frakce s molekulární hmotností větší než 30 kDa (Haberl a kol. 1995; Kalbe a kol. 1997).

Glykoproteiny, které jsou součástí SCW a atrahují miracidia, jsou označovány jako „miracidia-attracting glycoproteins“ (MAGs). MAGs hrají důležitou roli při přenosu parazita, zvyšují šanci se setkat s mezipostitelem a umožňují miracidu rozeznat své mezipostitele od dalších nevhodných druhů měkkýšů (Kalbe a kol. 2000). Tyto látky byly prokázány jako atraktanty u *S. mansoni*, *S. haematobium*, *T. szidati*, *F. hepatica* a *E. caproni*. Autoři se domnívají, že i ostatní druhy miracidí reagují spíše na MAGs, než na celé SCW (Haberl a Hass 1992; Haberl a kol. 1995, 2000; Kalbe a kol. 1997, 2000). U *S. mansoni*, *T. szidati* a *F. hepatica* je složení specifických glykoproteinů velmi podobné. Sacharidové řetězce jsou navázány O-glykosidickou vazbou k proteinu nejspíše přes threonin či serin a N-acetyl-D-galaktosamin. Signál rozpoznávaný miracidii je uložen v sacharidové části, což je velmi komplexní struktura. MAGs různých druhů plžů se liší ve složení sacharidových řetězců (Kalbe a kol. 1997, 2000). Muramová kyselina je součástí glykoproteinů a pravděpodobně patří mezi důležité složky při rozpoznávání plžů miracidii. Komplex makromolekul umožňuje parazitům najít a poznat své mezipostitele v zakaleném a bahnitém prostředí, kde mnoho malých molekul může být překážkou při vyhledávání kompatibilního měkkýše. Miracidia nereagují na malé molekuly, které jsou v blízkosti měkkýšů, a vyhýbají se tak nesprávné odpovědi (Haberl a kol. 1995; Haas a kol. 1995a).

Signální sacharidová struktura MAGs ještě nebyla přesně analyzována, ale tyto molekuly jsou účinné v koncentracích tak nízkých jako 1 mg v 10 000 litrech vody (Haas 2001). Není dosud objasněno, proč měkkýši během 400 milionů let dlouhé evoluce nezměnili složení hlenu a molekul rozpoznávaných miracidii. Jedna teorie uvádí, že glykoproteiny jsou důležité pro vnitrodruhovou komunikaci mezi měkkýši. Slouží jako feromony při vyhledávání jedinců stejného druhu k páření. (Haas 2001; Hertel a kol. 2006).

Bylo zkoumáno velké množství chemických látek, které miracidia atrahují, ale nejsou tak hostitelsky specifické jako SCW plžů. Atraktanty miracidii byly studovány s použitím např. různých typů komor (Etges a Decker 1963; Shiff 1968; Shiff a Kriel 1970; Roberts a kol. 1978) nebo nasycením agaru určitou látkou (MacInnis 1965). Často vzájemně nezávislé výsledky u stejného atraktantu byly protikladné. Důvodů může být několik, např. se jednotlivé pokusy odlišovaly použitím různých testovacích metod, které se nelze srovnávat. V některých případech stačila jako důkaz atraktivity látky akumulace miracidí. Ale shluk miracidí v místě atraktantu může také znamenat toxický efekt některé složky atraktivní chemické látky. Například ethanol, který způsobuje srovnatelnou akumulaci miracidí jako SCW, je jedovatý (Haas 1997). Také při získávání SCW měkkýšů mohli být plži ve vodě mnohem déle než je potřeba, takže jednotlivé složky SCW měly vyšší koncentraci než je běžné v přirozeném

prostředí (Haas a kol. 1995a; Haas 1997). Miracidia reagují na kyseliny jako jsou např. asparagová, glutamová, chlorovodíková, octová, N-acetylneuraminová a sírová (MacInnis 1965; Prechel a kol. 1976; Keshavarz-Valian a kol. 1981; Behrens a Nollen 1992; Nollen 1994).

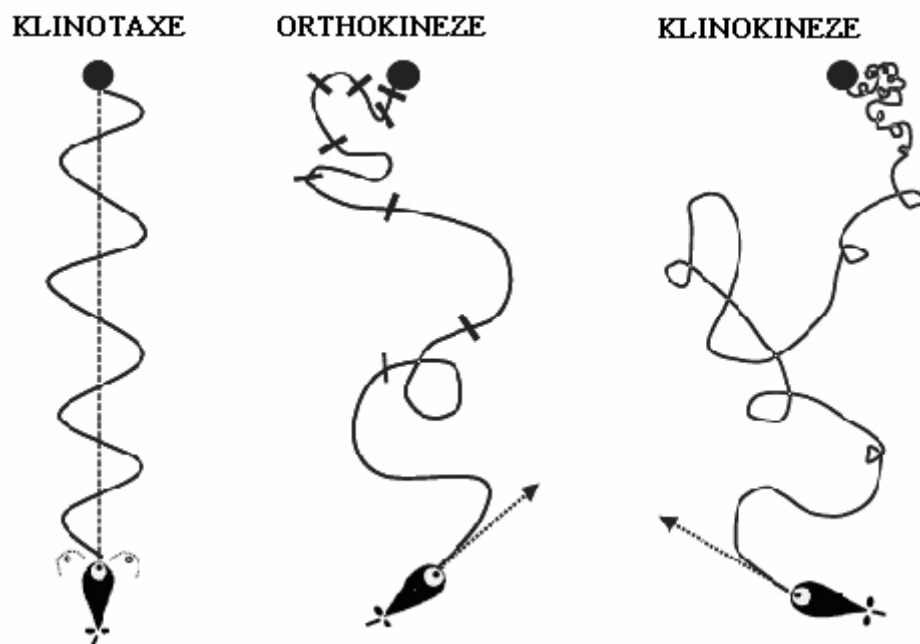
Pro některé druhy miracidí je též atraktivní vodíkový ion, amoniak, hořčnatý ion nebo určitý poměr iontů hořčíku a vápníku (MacInnis 1965; Sponholtz a Short 1976; Stibbs a kol. 1976; Mason a Fripp 1977; Keshavarz-Valian a kol. 1981; Nollen a Mart 1983; Nollen 1990). Možná i serotonin a acetylcholin jsou atraktanty miracidí, ale zatím byla prokázána jen jejich akumulace v přítomnosti těchto látek (MacInnis 1974; Stibbs a kol. 1976; Roberts a kol. 1978).

U většiny zkoumaných motolic zjišťujeme, že miracidia od sebe nedokáží rozlišit jednotlivé druhy plžů před kontaktem s nimi (Combes a Moné 1987; Haas a kol. 1991; Kalbe a kol. 1996). Ale některá miracidia ze studovaných motolic dokážou před navázáním kontaktu s měkkýšem rozpoznat, zda je pro ně meziphostitel specifický. Reagují na chemické signály (SCW), které se u plžů druhově liší. Tato schopnost miracidia zvýhodňuje, neboť se dokážou v mnoha jiných případech vyhnout kontaktu s nevhodným meziphostitelem. Toto chování bylo prokázáno jen u několika druhů motolic (Combes a Moné 1987), konkrétně u *S. haematobium* (Haberl a kol. 1995), egyptské populace *S. mansoni* (Kalbe a kol. 1996), *F. hepatica*, *T. szidati* (Kalbe a kol. 1997) a *H. conoideum* (Toledo a kol. 1999).

3.4.2. Chemoorientace miracidí

U miracidí se rozlišují dva druhy orientačního chování, které jsou vrozené a spouští se určitými signály z vnějšího prostředí. Jedná se o orientované (taxe) a neorientované (kineze) pohyby (obr. 3 a 4). Chemotaxí se miracidia pohybují buď přímo směrem ke zdroji chemického podnětu tzv. pozitivní taxe nebo od něho pryč tzv. negativní taxe. Z dosud zkoumaných miracidí se jen *S. japonicum* orientuje chemotakticky. Chemokineze je pohybová reakce, kde rychlost pohybu a frekvence otočení k chemickému stimulu závisí na jeho intenzitě. V místech se snižujícím se gradientem podnětu se miracidium vrací zpět. Tímto způsobem vyhledává meziphostitele většina miracidí, např. *F. hepatica*, *S. douthitti*, *S. haematobium*, *S. mansoni* a *T. szidati* (MacInnis 1965; Shiff 1969; Chernin 1970; Haas a kol. 1991, 1995a; Sukhdeo a Sukhdeo 2004).

Obr. 3: Tři druhy orientačního chování miracidí

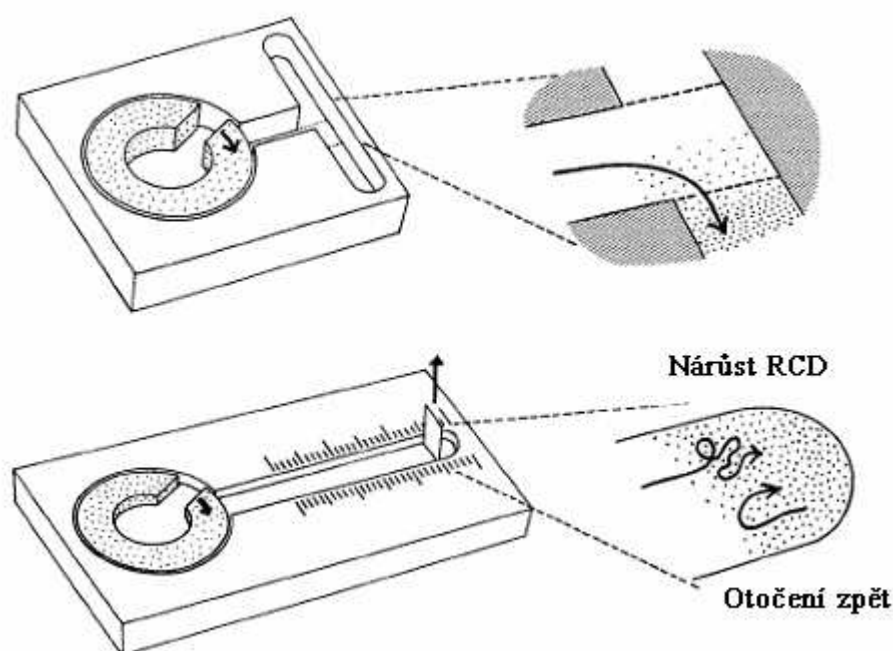


Vlevo je znázorněn pohyb miracidia směřující přímo ke stimulu s určitými symetrickými odchylkami. Nazýváme jej klinotaxe. Uprostřed miracidium zpomaluje svou rychlost tím více, čím je blíže podnětu, což označujeme jako orthokineze. Vpravo miracidium zvyšuje počet změn směru pohybu s intenzitou stimulu, ale rychlost je stále stejná. Tomuto orientačnímu chování miracidia říkáme klinokineze (upraveno podle Sukhdeo a Mettrick 1987).

Miracidia *E. caproni*, *F. hepatica*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mansoni* a *T. szidati* výhradně reagují na makromolekuly SCW nacházející se v blízkém okolí jejich meziphostitele. V přítomnosti těchto látek se velmi změní jejich chování a reagují dvěma způsoby (obr. 4). Se zvyšující se koncentrací SCW lze pozorovat velký počet změn směru pohybu tzv. „rate of change of direction“ (RCD). V případě snižující se koncentrace SCW se miracidia otáčejí zpět tzv. „turnback swimming“ (Haberl a Haas 1992; Haberl a kol. 1995; Haas a kol. 1995a). U ostatních druhů motolic se předpokládá, že miracidia se orientují stejným způsobem. Miracidia vykazují pohyb RCD a „turnback swimming“ i v přítomnosti jiné chemické látky, která je pro ně lákavá a nemusí být složkou SCW.

Všeobecně je RCD odpověď miracidia na změnu v jeho blízkém okolí, např. na chemické složení, změnu pH nebo teploty. RCD pohyb může mít různou délku trvání a intenzitu v závislosti na druhu podnětu (Haberl a kol. 1995; Kalbe a kol. 1997).

Obr. 4: Mechanismus chemoorientace miracidí



Chemoorientace miracidí se zkoumaná pomocí tzv. komor. Parazit je nejdříve v centrální komůrce, poté se komůrka otevře uzavíratelným kroužkem (na obr. označen tečkovaně).

Nahoře: Chemotaxe je pohyb typický pro miracidia *S. japonicum*.

Dole: Chemokineze se pohybuje většina zkoumaných druhů miracidí. V přítomnosti atraktantu se zvýší počet změn směru pohybu (RCD) a v případě snížení koncentrace se otáčí zpět do míst s vyšší koncentrací látky (upraveno podle Haas a kol. 1991, 1995a).

3.4.3 Mezihostitelská specifita miracidí motolic

Většina miracidí motolic jsou schopná se vyvíjet jen v několika druzích měkkýšů. Může se dokonce jednat pouze o jeden druh plže. Miracidia vyhledávají příslušného mezihostitele patrně díky vysoce specifickému chování. Je to cesta, jak zajistit, aby penetrovala jen do vhodného mezihostitele, který jim poskytne nejlepší podmínky pro jejich další vývoj (v mateřské sporocysty).

První experiment hostitelského chování miracidí byl proveden u *F. hepatica* (Thomas 1883, cit. dle Sukhdeo a Sukhdeo 2004; Leuckart 1894, cit. dle Sukhdeo a Sukhdeo 2004). Miracidia tohoto druhu motolice reagovala na některé látky hlenu *G. truncatula*. Pokusy se postupně prováděly na dalších motolicích začátkem 20. století, např. u *S. japonicum* či *Fasciolopsis buski*.

Mezihostitelská specifita miracidí je složitá a nebyla do dnešní doby zcela popsána (Haas 1997). Pro přesné pochopení mezihostitelské specifity je třeba studovat interakce

miracidíí jednotlivých druhů motolic se sympatrickými a alopatickými druhy plžů. Sympatrické druhy plžů obývají stejnou oblast. Opakem sympatrických druhů jsou druhy alopatické, které obývají navzájem různé areály. Když miracidium kontaktuje nekompatibilní meziphostitelský druh, sníží se šance miracidia úspěšně infikovat specifického měkkýše. Klesá tak tedy i pravděpodobnost nákazy definitivních hostitelů motolicemi. Sympatrické a alopatické druhy plžů, které parazitovi hostitelsky nevyhovují, v některých případech mohou sloužit jako „návnada“ pro parazita. Pomocí této návnady jako biologické ochrany se nám může podařit snížit populaci parazita, což může vést ke snížení množství infikovaných lidí (Kalbe a kol. 1996). Mimo jiné mohou být výsledky těchto studií užitečné v boji proti schistosomóze. Plž *Helisoma duryi* je návnada pro miracidia *S. mansoni* v přítomnosti plže *Biomphalaria pfeifferi* (Frandsen 1976). Po kontaktu miracidia *S. mansoni* s měkkýšem *Helisoma caribaeum* není miracidium schopné penetrovat do svého specifického meziphostitele (Chernin a Perlstein 1969).

Přirozeným meziphostitelem miracidia *Echinostoma friedi* je sladkovodní plž *R. peregra* v parku Albufera ve Španělsku (Toledo a kol. 1998). Miracidia jsou schopná nakazit a vyvíjet se v sympatrických plžích (*Stagnicola fuscus*, *G. truncatula* a *Gyraulus chinensis*) či alopatické druhy (*B. glabrata* a *Bulinus cernicus*), což bylo pozorováno v experimentálních podmínkách. Tito plži patří do tří čeledí (Lymnaeidae, Planorbidae, Bulinidae). Miracidia *E. friedi* nejvíce napadají plže *R. peregra* a *S. fuscus*. Všichni jedinci druhu *G. truncatula* a *B. cernicus* uhynuli po naze *E. friedi* ještě před uvolněním cercárií v laboratorních podmínkách (Toledo a kol. 2000; Muñoz-Antoli a kol. 2002, 2006).

Miracidia *Hypoderaeum conoideum* napadají přibližně stejnou měrou plže *R. peregra* a *Stagnicola corvus*, jsou-li jim plži vystaveni jednotlivě. Pokud má první larvální stadium *H. conoideum* příležitost si vybrat mezi oběma druhy, tak upřednostňuje druh *R. peregra* (Toledo a kol. 1999).

Ptačí schistosomy *T. szidati* i *Trichobilharzia franki* vykazují vysokou meziphostitelskou specifitu. Miracidia upřednostňují příslušné přirozené meziphostitele před dalšími sympatrickými druhy měkkýšů. *Trichobilharzia szidati* je schopná se vyvíjet v *L. stagnalis* a *Stagnicola palustris*, ale plž *Radix ovata* nebo *Radix auricularia* jsou pro ni hostitelsky nevhodní. U motolice *T. franki* jsou jejími specifickými meziphostiteli *R. ovata* nebo *R. auricularia*, ale nedokáže se vyvíjet v *L. stagnalis* a *S. palustris* (Kock 2001).

V experimentálních podmínkách jsou měkkýši vystaveni miracidii jen v několika mililitrech vody, a tak miracidia nepotřebují hledat a rozpoznávat své meziphostitele. Tato miracidia si díky tomu "uspořila" zdroje energie, a jsou tak lépe schopna překonat vnitřní

obraný systém měkkýše (Kalbe a kol. 1996, 2004). Pravděpodobně změna specifity je časově mnohem náročnější než získání schopnosti vyrovnat se s měkkýším vnitřním obranným systémem (Kalbe a kol. 2004).

Miracidia při nákaze plže dokonce preferují určitou velikost meziphostitele. Subadultní plži (velikosti 7 až 9 mm) jsou nejatraktivnější pro miracidia *S. mansoni* v přítomnosti juvenilních (3-5 mm) a adultních (11-13 mm) jedinců *B. glabrata*. Dospívající plži jsou nejvýhodnější pro parazita z hlediska jeho vývoje a rozmnožování. V případě vystavení jedinců *B. glabrata* různého stáří individuálně miracidium *S. mansoni* pak *S. mansoni* penetruje nejčastěji do juvenilních jedinců. Juvenilní stadium je méně vhodné pro vývoj parazita z několika důvodů, např. vyšší úmrtnosti mladých infikovaných jedinců nebo omezené množství energie, čímž je potlačována reprodukce parazita (Théron a kol. 1998).

Adaptace většiny motolic na úzké spektrum meziphostitelských měkkýšů s sebou může přinést také určité nevýhody pro parazita. Co se stane, když populace kompatibilního meziphostitele vymizí z daného biotopu? Dokáže motolice přežít nebo uhynie? Z dosavadních výsledků můžeme usoudit, že se motolice dokážou přizpůsobit novým podmínkám. Například *S. mansoni* se v Africe vyvíjí 1-4 milióny let s populací místních měkkýšů (Morgan a kol. 2001). Před 150-500 lety byl tento druh schistosomy zavlečen do Jižní Ameriky společně s africkými otroky. Jelikož se miracidium podařilo najít nového kompatibilního meziphostitele *B. glabrata*, mohla se *S. mansoni* úspěšně rozšířit na nové území (Haas 2003).

3.4.3.1 Geografická variabilita miracidíu motolic

U některých druhů motolic se může lišit spektrum meziphostitelů podle geografického výskytu v rámci jednoho druhu.

Většina druhů schistosom je schopna se vyvíjet jen v určité skupině měkkýšů a některé schistosomy jsou vázány na specifický druh v závislosti na geografickém umístění (Sapp a Loker 2000; Allan a kol. 2009). Ve východní části Afriky se *S. haematobium* dokáže vyvíjet pouze v *B. globosus*, ale v Keni toto miracidium nerozlišuje druh plže *B. globosus* od *Bulinus nasutus* (Kariuki a kol. 2004). Na Zanzibarských ostrovech se opět vyvíjí jen v *B. globosus* (Stothard a kol. 2000; Allan a kol. 2009). Motolice *S. haematobium* z Unguji dokáže rozlišit svého specifického hostitelského měkkýše *B. globosus* od sympatrických druhů *Cleopatra ferruginea* a *Thiara scabra*, kteří pro ni nejsou vhodnými meziphostiteli. Také dokáže před penetrací rozpoznat, zda již daný jedinec *B. globosus* není infikovaný *S. haematobium* (Allan a kol. 2009). Miracidium *S. haematobium* se na Unguji nemůže setkat s alopatrickým druhem

B. nasutus, ale v experimentálních podmínkách nijak významně nepreferuje plže *B. globosus* před *B. nasutus* (Allan a kol. 2009).

Plži, kteří žijí společně s motolicemi ve stejném habitatu, mohou být vhodní pro vývoj motolice. Stupeň kompatibility mezi parazitem a meziphostitelem není založen jen na počtu nakažených plžů, ale také záleží, jaké množství infikovaných měkkýšů přežije a kolik cercárií opustí tělo meziphostitele (Gasnier a kol. 2000; Muñoz-Antoli a kol. 2006). Druhově široké spektrum meziphostitelů (*R. peregra*, *S. fuscus*, *G. chinensis*) může znamenat, že miracidium *E. friedi* mohlo ztratit původní meziphostitelskou specifitu. Podobná situace byla nedávno popsána u *S. mansoni* v Africe (Kalbe a kol. 1996; Hassan a kol. 2003; Muñoz -Antoli a kol. 2006).

Miracidia *S. mansoni* v Egyptě preferují plže *Biomphalaria alexandrina*, kterého dokážou odlišit od ostatních druhů plžů i po pěti cyklech v nepřírodném meziphostiteli (albinotický izolát *B. glabrata*) v experimentálních podmínkách. Stále ho upřednostňují před ostatními druhy měkkýšů. U jedinců stejného druhu parazita žijícího v Brazílii je známo, že reaguje srovnatelně na svého přírodního meziphostitele *B. alexandrina* i na jiné druhy plžů - *B. glabrata* a *L. stagnalis*. Při vyhledávání svého meziphostitele nepreferují miracidia *S. mansoni* amerického plže *B. glabrata* před africkým druhem. Hostitelsky je pro ně atraktivní i plž *L. stagnalis* (Kalbe a kol. 1996, 2004). Hassan a kol. (2003) znovu provedli výzkum, v němž navazovali na výsledky publikované Kalbe a kol. (1996), kdy porovnávali specifitu *S. mansoni* v Egyptě a v Brazílii. Potvrdili, že miracidia *S. mansoni* v Egyptě rozlišují svého specifického plže *B. alexandrina* od hostitelsky nevhodných sympatrických druhů. Navíc zjistili, že miracidia *S. mansoni* z Egypta i Brazílie též rozpoznávají plže *B. arabica*, který je přírodním meziphostitelem *S. mansoni* jen v Africe. Egyptský izolát nereaguje na měkkýše *B. glabrata*, který je meziphostitelem stejného parazita v Jižní Americe. Zřejmě brazilská *S. mansoni* ztratila schopnost rozpoznat jednotlivé druhy plžů. Reaguje i na alopatrické plže *Physa acuta*, *B. truncatus* a *Lymnaea cailliudi* pocházející z Egypta. Podobná nespecifita byla zatím zjištěna jen u *E. caproni* a *E. friedi* (Haberl a kol. 2000; Muñoz -Antoli a kol. 2003). Snížení meziphostitelské specifity u *S. mansoni* žijící v Brazílii může odrážet degeneraci chování parazita, který je v laboratoři udržován již více než 30 let. Snížení specifity může také souviset s teorií, která se týká poměrně nedávného rozšíření *S. mansoni* do Ameriky s transporty otroků ze západní Afriky (Files a Cram 1949; Morgan a kol. 2001). Během adaptace na nové hostitelské druhy měkkýšů mohla *S. mansoni* ztratit svou původní druhovou meziphostitelskou specifitu, protože bylo zjištěno, že silně reaguje na alopatrický druh plže *L. stagnalis*.

Předpokládalo se, že *B. alexandrina* bude pro brazilský izolát *S. mansoni* neatraktivní, protože se s tímto druhem plže nemůže během svého života setkat. Měkkýš *B. alexandrina* se přirozeně vyskytuje jen v nejbližším okolí řeky Nil. Ale proti předpokladu je pro miracidia brazilské *S. mansoni* atraktivnější plž *B. alexandrina* než jejich přirozený meziphostitel *B. glabrata* v Brazílii (Kalbe a kol. 1996; Hassan a kol. 2003; Kalbe a kol. 2004). Ztráta specifity brazilského izolátu *S. mansoni* k plži *B. alexandrina* a zachování vysoké meziphostitelské specifity u egyptského izolátu druhu *S. mansoni* i po několika letech udržování cyklu v laboratoři, se vysvětluje několika teoriemi (Kalbe a kol. 2004).

Kalbe a kol. (2004) pozorovali chování kříženců druhu *S. mansoni* pocházející z Egypta a Brazílie při vyhledávání meziphostitele. V F1 generaci kříženci obou rodičovských kombinací vykazovali stejně nízkou specifitu jako původní brazilský druh *S. mansoni*. Přibližně jedna čtvrtina hybridů F2 generace se chovala jako miracidia egyptské *S. mansoni*. Takže nespecifické meziphostitelské chování miracidí je geneticky dominantní podle Mendelova zákona jednoduché dominance. Je možné, že dominantní alela pro sníženou schopnost rozpoznávat meziphostitele byla vždy přítomna v nízké frekvenci u africké populace izolátu *S. mansoni*. I jen malý počet jedinců *S. mansoni* s tímto genotypem by mohl být dostatečný, aby se stal zakladatelem generace po přenesení do Ameriky, protože dominantní alela miracidia *S. mansoni* snižuje přesnost rozpoznání meziphostitele a zvyšuje pravděpodobnost setkání s potenciálními novými meziphostitelskými druhy.

Velmi nízký počet nakažených izolátů *B. alexandrina* miracidii F1 kříženců egyptského a brazilského izolátu *S. mansoni* nesouhlasí s většinou pozorování u jiných kříženců druhů nebo izolátů rodu *Schistosoma*. Miracidia F1 kříženců jsou obvykle kompatibilní s měkkýši, kteří jsou specifictí u obou rodičů těchto kříženců. Ztráta specifity při hledání meziphostitele F1 kříženců *S. mansoni* a schopnost úspěšně se vyvinout v *B. alexandrina* možná naznačuje vzájemný vztah mezi kompatibilitou a meziphostitelským rozpoznáváním. Dědičnost tohoto rysu chování má evoluční a epidemiologický význam, protože snížením meziphostitelské specifity miracidia se může motolice rozšířit na nové území (Kalbe a kol. 2004).

Onemocnění způsobené *S. haematobium* v lidské populaci na Zanzibarských ostrovech je limitováno četností setkání *S. haematobium* s nekompatibilním plžem *B. nasutus*. Toto onemocnění je u lidí rozšířeno především v severní a střední části ostrova Unguja, kde se vyskytuje specifický meziphostitel *B. globosus* (Stothard a kol. 2000, 2006; Rudge a kol. 2008). Z tohoto důvodu je nepravděpodobné, že se na Unguje miracidium *S. haematobium* setká s nevhodným meziphostitelem *B. nasutus*, který se vyskytuje jen v jižní části ostrova.

Stothard a kol. (2000) navrhli teorii, že populace *S. haematobium* na Zanzibaru by mohla být snížena pomocí alopatrického plže *B. nasutus* sloužícího jako biologická návnada pro miracidia k přerušení životního cyklu a tím snížení populace motolice. Je však mnoho argumentů proti používání *B. nasutus* jako biologické návnady pro *S. haematobium*. Je zde totiž riziko, že zavedením *B. nasutus* do životního cyklu by mohlo ve skutečnosti vést k přizpůsobení a zvýšení přenosu *S. haematobium* v dlouhodobějším horizontu (Kariuki a kol. 2004).

3.5 Chování miracidí po kontaktu s meziphostitelem

Po kontaktu miracidia s povrchem meziphostitele pozorujeme několik rozdílných vzorců chování. Opakované zkoumání, navázání kontaktu a penetrace se zdají typickými odpověďmi po kontaktu s vhodným meziphostitelem u *S. mansoni* (MacInnis 1965). U miracidí schistosom toto chování vyvolávají makromolekulární glykoproteiny tzv. MAGs, (Haas a kol. 1991; Haberl a Hass 1992; Haas a kol. 1995a). Plž vylučuje důležité podněty (např. pro přisednutí miracidia k povrchu meziphostitele a následné chování během penetrace), které jsou velmi málo prostudované.

3.5.1 Penetrace

Miracidia se snaží vyhnout penetraci do nevhodného meziphostitele, protože díky špatnému výběru mohou uhynout. Uvnitř nekompatibilního měkkýše nejsou dobré podmínky k vývoji parazita, např. se nedokáže vypořádat s vnitřním obranným systémem plže. Z toho vyplývá, že je pro miracidium nezbytné rozpoznat vhodného měkkýše, aby jeho životní cyklus mohl pokračovat (Whittington 1997; Kalbe a kol. 2000).

Po přisednutí na povrch plže začne miracidium produkovat cytolytické a histolytické enzymy, které jsou vylučovány apikální žlázou a přídatnými žlázatými buňkami. Enzymy rozkládají epitel meziphostitele a subepiteliální tkáň, přičemž miracidium se dostane dovnitř těla meziphostitele do deseti minut po přisednutí k povrchu plže (Dawes 1959, 1960, cit. dle Cheng 1968). Při penetraci musí miracidium překonat bariéru, kterou lze rozdělit do tří vrstev. Na povrchu těla meziphostitele je vnější vrstva tvořena hlenem a epiteliálními buňkami s mikrokly. Tato vrstva hraje důležitou roli při prvním kontaktu miracidia s povrchem těla meziphostitele. Pravděpodobně obsahuje důležité látky, které zajišťují přichycení miracidia (Wilson a kol. 1968, cit. dle Wilson a kol. 1971). Sloupcovité epiteliální buňky tvoří druhou vrstvu bohatou na proteiny s malým množstvím sacharidů. Vnitřní vrstva je složena ze svalů,

žlázových buněk a pojivové tkáně. Pokud miracidium pronikne do správného druhu plže, tak se v této poslední vrstvě nacházejí sporocysty (Wilson a kol. 1971). Zatímco miracidium proniká do meziphostitele, ztrácí postupně ciliární epitelální buňky od přední části těla a ty jsou nahrazovány neodermis.

3.6 Ochrana meziphostitele

Chování miracidia při vyhledávání meziphostitele může ovlivňovat přítomnost nespecifických plžů nebo jiných vodních organismů ve společenství specifických měkkýšů. Jejich přítomnost má vliv na schopnost miracidia se orientovat směrem ke svému meziphostiteli a úspěšně do něj proniknout. Tedy slouží jako návnada pro parazita. Plži, kteří slouží jako návnada, velmi často ochrání specifického meziphostitele před infekcí parazitem. Buď může být návnada umístěna mezi miracidem a specifickým meziphostitelem nebo také miracidium ovlivňuje, když se nachází ve stejné oblasti jako specifický měkkýš (Chernin 1968).

Combes a Moné (1987) navrhli čtyři situace, kdy v přítomnosti nespecifického plže miracidium nepřežije: (1) penetrace do nevhodného hostitele (Chernin 1968), (2) vyčerpání nebo poškození miracidia během snahy proniknout do nespecifického měkkýše (Chernin 1968; Chernin a Perlstein 1969), (3) miracidium kontaktuje nekompatibilního měkkýše, následně se setká se svým specifickým meziphostitelem a během penetrace uhynie (4) toxický vliv látek vylučovaných nespecifickým meziphostitelem.

Chernin a Perlstein (1971) prováděli pokusy snažící se ochránit *B. glabrata* před miracidii *S. mansoni* vodními bezobratlými. Byly vybrány ploštěnky, larvy komárů *Culex pipiens* a *Aedes aegypti*. Někteří bezobratlí živočichové mohou velmi ovlivnit nákazu motolic u plžů v přirozených podmínkách. Ploštěnky *D. tigrina* nebo produkce jejich hlenu chrání *B. glabrata* před infekcí miracidii *S. mansoni*. Po setkání miracidii s produkty, které vylučují ploštěnky, se miracidia okamžitě přestanou hýbat a během několika minut uhynou. Těž miracidia *F. hepatica* uhynou při snaze penetrovat do ploštěnky nebo v přítomnosti jejího hlenu (Mattes 1932, cit. dle Chernin a Perlstein 1971). Miracidia neinfikovala larvy komárů, ale naopak některé larvy je zachytily pomocí štětin kolem úst. Larvy *C. pipiens* zachytily více miracidii než larvy komára *A. aegypti*, pokud oba dva druhy larev byly vystaveny miracidii odděleně.

Upatham a Sturrock (1973) použili pět vodních živočichů (dva druhy plžů - *Physa marmorata* a *Pomacea glaucus*, rybu druhu *Poecilia reticulata*, garnáta *Atya innocous* a pulce žáby druhu *Bufo marinus*) ke snížení nákazy specifického plže *B. glabrata* miracidii

S. mansoni v jejich přirozeném habitatu. Každý z pěti druhů vodních živočichů ovlivnil infekci u specifického meziphostitele. Ryba druhu *P. reticulata* a garnát *A. innocens* jsou predátoři, takže miracidia požírají. Ale i miracidia *S. mansoni* do ryby *P. reticulata* penetrují. Plž *P. marmorata* vystaven jako jediná návnada má nejúčinnější efekt před nákazou *B. glabrata*. V přirozeném prostředí objevujeme další vodní organismy, kteří mohou ovlivnit infekci *B. glabrata* miracidii *S. mansoni* a jeden organismus jako návnada může mít vliv na přítomnost dalších organismů.

Nekompatibilní měkkýš *R. peregra* je velkým lákadlem pro miracidia *Euparyphium albuferensis*. Přítomnost plže *S. fuscus* neovlivňuje schopnost miracidii *E. albuferensis* infikovat svého meziphostitele *G. chinensis* (Muñoz-Antoli a kol. 2003). Podobné výsledky zjistili Christensen a kol. (1976) pozorováním miracidii *F. hepatica*, jejichž specifickým meziphostelem je *G. truncatula*. Plži *R. peregra* a *S. fuscus* atrahují miracidia *F. hepatica*, ale ostatní druhy měkkýšů *Gyraulus albus*, *Planorbis planorbis*, *Physa fontinalis* a *A. vortex* v tomto pokusu neovlivnily miracidia při výběru svého specifického meziphostitele.

4. Závěr

Motolice jsou velmi rozšíření parazité. Zapříčiňují závažná onemocnění zvířat i člověka. Studium meziphostitelské specifity miracidí by mělo být přínosem ke snížení počtu nákaz a úmrtí. Přerušením životních cyklů motolic zabráníme motolicím vyvinout se v dospělého jedince schopného se sexuálně rozmnožovat.

Po vylíhnutí z vajíčka miracidium reaguje především na světlo a gravitační sílu. Tyto podněty miracidium pomáhají najít místo přirozeného výskytu meziphostitele. Miracidium pravděpodobně rozeznává molekuly, které jsou součástí hlenu měkkýše. Tyto látky jsou označovány jako makromolekulární glykoproteidy, tzv. MAGs. Chemické složení sacharidové části se nepatrně liší u různých druhů plžů, přičemž podle této části řetězce miracidium rozezná kompatibilního měkkýše. Signál uložený v sacharidovém řetězci je pro miracidium velmi důležitý, bez něj by nedokázalo najít vhodného meziphostitele a nepokračoval by vývoj parazita. Miracidium se pohybuje směrem k chemickému stimulu buď chemotaxí nebo chemokinezí. Všechna zkoumaná miracidia kromě *S. japonicum* jsou chemotaktická. V přítomnosti atraktantu (MAGs specifického plže) u miracidí pozorujeme časté změny směru pohybu tzv. „rate of change of direction“ (RCD) a v místech se snižující se koncentrací SCW, miracidia se otáčejí zpět, tzv. „turnback swimming“. Po rozpoznání specifického druhu měkkýše, do něj penetruje a přemění se na sporocystu. Jedna z důležitých charakteristik motolic je meziphostitelská specifita. Usnadňuje miracidium najít kompatibilního meziphostitele. Často je vhodný jen jeden druh měkkýše pro přeměnu a další vývoj motolice. Meziphostitelská specifita se může odlišovat i v rámci jednoho druhu motolice a to na základě zeměpisné oblasti.

Většina dosud používaných chemických látek, které slouží ke snížení populace meziphostitelů miracidí, narušuje celý ekosystém. Objasněním přesného složení sacharidového řetězce, který rozpoznávají miracidia, by mohlo vést k vytvoření „pastí“ pro miracidia. Tato možnost by byla šetrná k životnímu prostředí a nebylo by nutné zasahovat do populace meziphostitelů.

5. Použitá literatura

Allan F., Rollinson D., Smith J. E. , Dunn A. M. (2009): Host choice and penetration by *Schistosoma haematobium* miracidia. *Journal of Helminthology* 83: 33–38.

Basch P. F. (1976): Intermediate Host Specificity in *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology* 39: 150-169.

Behrens A. C., Nollen P. M. (1992): Responses of *Echinostoma caproni* miracidia to gravity, light, and chemicals. *International Journal for Parasitology* 22: 673–675.

Blažová K., Horák P. (2005): *Trichobilharzia regenti*: The developmental differences in natural and abnormal hosts. *Parasitology International* 54: 167–172.

Campbell W. C., Todd A. C. (1955): Behavior of the miracidium of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) Ward, 1917 in the presence of a snail host. *Transactions of the American Microscopical Society* 74: 342-347.

Combes C., Moné H. (1987): Possible mechanisms of the decoy effect in *Schistosoma mansoni* transmission. *International Journal for Parasitology* 17: 971–975.

Doehring E., Feldmeier H., Daffalla A. A. (1983): Day-to-day variation and circadian rhythm of egg excretion in urinary schistosomiasis in the Sudan. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 77: 587-594.

Etges F. J., Decker C. L. (1963): Chemosensitivity of the miracidium of *Schistosoma mansoni* to *Australorbis glabratus* and other snails. *Journal of Parasitology* 49: 114-116.

Faust E. C. (1924): The reactions of the miracidia of *Schistosoma japonicum* and *S. haematobium* in the presence of their intermediate hosts. *Journal of Parasitology* 10: 199-204.

Files V. S., Cram E. B. (1949): A study on the comparative susceptibility of snail vectors to strains of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology* 35: 555-560.

Frandsen F. (1976): The suppression, by *Helisoma duryi*, of the cercarial production of *Schistosoma mansoni*-infected *Biomphalaria pfeifferi*. *Bulletin of the World Health Organization* 53: 385-390.

Gasnier N., Rondelaud D., Abrous M., Carreras F., Boulard C., Diez-Baños P., Cabaret J. (2000): Allopatric combination of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea truncatula* is more efficient than sympatric ones. *International Journal for Parasitology* 30: 573–578.

Haas W (1997): The behavioral biology of Echinostomes. *Echinostomes as Experimental Models for Biological Research*. Edited by Fried B., Graczyk T. K. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, s. 177-179.

Haas W. (2001): Digenea. *Encyclopedic Reference of Parasitology*. Edited by Mehlhorn H. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, s. 164-171.

- Haas W. (2003):** Parasitic worms: strategies of host finding, recognition and invasion. *Zoology* 106: 349-364.
- Haas W., Gui M., Haberl B., Ströbel M. (1991):** Miracidia of *Schistosoma japonicum*: approach and attachment to the snail host. *Journal of Parasitology* 77: 509-513.
- Haberl B., Haas W. (1992):** Miracidium of *Schistosoma mansoni*: a macromolecular glycoconjugate as signal for the behaviour after contact with the snail host. *Comparative Biochemistry and Physiology* 101: 329-333.
- Haas W., Haberl B., Kalbe M., Körner M. (1995a):** Snail-host finding by miracidia and cercariae: chemical host cues. *Parasitology Today* 11: 468-472.
- Haberl B., Kalbe M., Fuchs H., Ströbel M., Schmalfuss G., Haas W. (1995):** *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium*: miracidial host-finding behavior is stimulated by macromolecules. *International Journal for Parasitology* 25: 551-560.
- Haberl B., Körner M., Spengler Y., Hertel J., Kalbe M., Haas W. (2000):** Host-finding in *Echinostoma caproni*: miracidia and cercariae use different signals to identify the same snail species. *Parasitology* 120: 479-486.
- Hassan A. H. M., Haberl B., Hertel J., Haas W. (2003):** Miracidia of an Egyptian strain of *Schistosoma mansoni* differentiate between sympatric snail species. *Journal of Parasitology* 89: 1248-1250.
- Hertel J., Holweg A., Haberl B., Kalbe M., Haas W. (2006):** Snail odour-clouds: spreading and contribution to the transmission success of *Trichobilharzia ocellata* (Trematoda, Digenea) miracidia. *Oecologia* 147: 173-180.
- Horák P., Scholz T. (1999):** Biologie helmintů. Karolinum, Praha. české učebnice
- Cheng T. C. (1968):** The compatibility and incompatibility concept as related to Trematodes and molluscs. *Pacific Science* XXII: 141-160.
- Chernin E. (1968):** Interference with the capacity of *Schistosoma mansoni* miracidia to infect the molluscan host. *Journal of Parasitology* 54: 509-516.
- Chernin E. (1970):** Behavioral responses of miracidia of *Schistosoma mansoni* and other Trematodes substances emitted by snails. *Journal of Parasitology* 56: 287-296.
- Chernin E., Dunavan C. A. (1962):** The influence of host-parasite dispersion upon the capacity of *Schistosoma mansoni* miracidia to infect *Australorbis glabratus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2: 455-471.
- Chernin E., Perlstein J. M. (1969):** Further studies on interference with the host-finding capacity of *Schistosoma mansoni* miracidia. *Journal of Parasitology* 55: 500-508.
- Chernin E., Perlstein J. M. (1971):** Protection of snails against miracidia of *Schistosoma mansoni* by various aquatic invertebrates. *Journal of Parasitology* 57: 217-219.

- Christensen N. Ø., Nansen P., Frandsen F. (1976):** Molluscs interfering with the capacity of *Fasciola hepatica* miracidia to infect *Lymnaea truncatula*. *Parasitology* 73: 161-167.
- Kalbe M., Haberl B., Haas W. (1996):** *Schistosoma mansoni* miracidial host-finding: species specificity of an Egyptian strain. *Parasitology Research* 82: 8–13.
- Kalbe M., Haberl B., Haas W. (1997):** Miracidial host-finding in *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata* is stimulated by species-specific glycoconjugates released from the host snails. *Parasitology Research* 83: 806-812.
- Kalbe M., Haberl B., Haas W. (2000):** Snail host finding by *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata*: compound analysis of „miracidia-attracting glycoproteins“. *Experimental Parasitology* 96: 231-242.
- Kalbe M., Haberl B., Hertel J., Haas W. (2004):** Heredity of specific host-finding behaviour in *Schistosoma mansoni* miracidia. *Parasitology* 128: 635–643.
- Kassim O., Gilbertson D. E. (1976):** Hatching of *Schistosoma mansoni* eggs and observations on motility of miracidia. *Journal of Parasitology* 62: 715-720.
- Keshavarz-Valian H., Nollen P. M., Maynard G. (1981):** *Philophthalmus gralli*: chemosensitivity of miracidia. *Journal of Parasitology* 67: 527-530.
- Kock S. (2001):** Investigations on intermediate host specificity help to elucidate the taxonomic status of *Trichobilharzia ocellata* (Digenea: Schistosomatidae). *Parasitology* 123: 67–70.
- MacInnis A. J. (1965):** Responses of *Schistosoma mansoni* miracidia to chemical attractants. *Journal of Parasitology* 51: 731-746.
- MacInnis A. J., Bethel W. M., Cornford E. M. (1974):** Identification of chemicals of snail origin that attract *Schistosoma mansoni* miracidia. *Nature* 248: 361-363.
- McMahon J. E. (1976):** Circadian rhythm in *Schistosoma haematobium* egg excretion. *International Journal for Parasitology* 6: 373-377.
- Mason P. R., Fripp P. J. (1976):** Analysis of the movements of *Schistosoma mansoni* miracidia using dark-ground photography. *Journal of Parasitology* 62: 721-727.
- Meece J. K., Nollen P. M. (1996):** A Comparison of the adult and miracidial stages of *Echinostoma paraensei* and *E. caproni*. *International Journal for Parasitology* 26: 37-43.
- Moné H., Fournier A. (1994):** Effects of snail-conditioned water on survival and host-searching behaviour of schistosome miracidia. *Animal Behaviour* 48: 1-8.
- Morgan J. A. J., DeJong R. J., Snyder S. D., Mkoji G. M., Loker E.S. (2001):** *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. *Parasitology* 123: 211–228.

- Muñoz-Antoli C., Trelis M., Gozalbo M., Toledo R., Haberl B., Esteban J. G. (2003):** Interactions related to non-host snails in the host-finding process of *Euparyphium albuferensis* and *Echinostoma friedi* (Trematoda: Echinostomatidae) miracidia. *Parasitology Research* 91: 353–356.
- Muñoz-Antoli C., Trelis M., Toledo R., Esteban J. G. (2006):** Infectivity of *Echinostoma friedi* miracidia to different snail species under experimental conditions. *Journal of Helminthology* 80: 323–325.
- Nollen P. M. (1990):** Chemosensitivity of *Philophthalmus megalurus* (Trematoda) miracidia. *Journal of Parasitology* 76: 439–440.
- Nollen P. M. (1994):** The hatching behavior of *Echinostoma trivolvis* miracidia and their responses to gravity, light and chemicals. *International Journal for Parasitology* 24: 637–642.
- Nollen P. M., Mart D. A. (1983):** Chemosensitivity of *Megalodiscus temperatus* miracidia to Mg, ammonia and hydrogen ion. *Journal of Parasitology* 69: 631–632.
- Pan S. C. (1980):** The fine structure of the miracidium of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Invertebrate Pathology* 36: 307–72.
- Plorin G. G., Gilbertson D. E. (1981):** Behavior of *Schistosoma mansoni* miracidia upon contacting solid surfaces. *Journal of Parasitology* 67: 727–728.
- Prechel D. P., Cain G. D., Nollen P. M. (1976):** Responses of *Megalodiscus temperatus* miracidia to amino and sialic acids found in snail-conditioned water. *Journal of Parasitology* 62: 693–697.
- Prechel D. P., Nollen P. M. (1979):** The effect of miracidial aging and dilution of snail-conditioned water on response of miracidia of *Megalodiscus temperatus*. *Journal of Parasitology* 65: 446–450.
- Roberts T. M., Stibbs H. H., Chernin E., Ward S. (1978):** A simple quantitative technique for testing behavioral responses of *Schistosoma mansoni* miracidia to chemicals. *Journal of Parasitology* 64: 277–282.
- Rudge J. W., Stothard J. R., Basáñez M. G., Mgeni A. F., Khamis I. S., Khamis A. N., Rollinson D. (2008):** Micro-epidemiology of urinary schistosomiasis in zanzibar: Local risk factors associated with distribution of infections among schoolchildren and relevance for kontrol. *Acta Tropica* 105: 45–54.
- Saladin K. S. (1979):** Behavioral parasitology and perspectives on miracidial host-finding. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 60: 197–210.
- Sapp K. K., Loker E. S. (2000):** Mechanisms underlying digenean-snail specificity: role of miracidial attachment and host plasma factors. *Journal of Parasitology* 86: 1012–1019.
- Shiff C. J. (1968):** Location of *Bulinus (Physopsis) globosus* by miracidia of *Schistosoma haematobium*. *Journal of Parasitology* 54: 1133–1140.

- Shiff C. J. (1969):** Influence of light and depth on location of *Bulinus (Physopsis) globosus* by miracidia of *Schistosoma haematobium*. Journal of Parasitology 55: 108-110.
- Shiff C. J. (1974):** Seasonal factors influencing the location of *Bulinus (Physopsis) globosus* by miracidia of *Schistosoma haematobium*. Journal of Parasitology 60: 578-583.
- Shiff C. J., Kriel R. L. (1970):** A water-soluble product of *Bulinus (Physopsis) globosus* attractive to *Schistosoma haematobium* miracidia. Journal of Parasitology 56: 281-286.
- Sponholtz G. M., Short R. B. (1976):** *Schistosoma mansoni* miracidia: stimulation by Calcium and Magnesium. Journal of Parasitology 62: 155-157.
- Stabrowski A., Nollen, P. M. (1985):** The responses of *Philophthalmus gralli* and *P. megalurus* miracidia to light, gravity and magnetic fields. International Journal for Parasitology 15: 551-555.
- Steinmann P., Keiser J., Bos R., Tanner M., Utzinger J. (2006):** Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. Lancet Infectious Diseases 6: 411-425.
- Stibbs H. H., Chernin E., Ward S., Karnovsky M. L. (1976):** Magnesium emitted by snails alters swimming behaviour of *Schistosoma mansoni* miracidia. Nature 260: 702-703.
- Stothard J. R., Loxton N., Rollinson D., Mgeni A. F., Khamis S., Ameri H., Ramsan M., Savioli L. (2000):** The transmission status of *Bulinus* on Zanzibar Island (Unguja), with implications for control of urinary schistosomiasis. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 94: 87-94.
- Stothard J. R., Mook P., Mgeni A. F., Khamis S., Khamis A. N., Rollinson D. (2006):** Control of urinary schistosomiasis on Zanzibar (Unguja Island): a pilot evaluation of the educational impact of the Juma na Kichocho health education booklet within primary schools. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 101: 119-124.
- Sukhdeo M. V. K., Mettrick D. F. (1987):** Parasite behaviour: understanding platyhelminth responses. Advances in Parasitology 26: 74-144.
- Sukhdeo M. V. K., Sukhdeo S. C. (2004):** Trematode behaviours and the perceptual worlds of parasites. Canadian Journal of Zoology 82: 292-315.
- Théron A., Rognon A., Pagès J. R. (1998):** Host choice by larval parasites: a study of *Biomphalaria glabrata* snails and *Schistosoma mansoni* miracidia related to host size. Parasitology Research 84: 727-732.
- Toledo R., Muñoz-Antoli C., Pérez M., Esteban J. G. (1998):** Larval trematode infection in freshwater gastropods from the Albufera Natural Park in Spain. Journal of Helminthology 72: 79-82.
- Toledo R., Muñoz-Antoli C., Pérez M., Esteban J. G. (1999):** Miracidial infectivity of *Hypoderaeum conoideum* (Trematoda: Echinostomatidae): differential susceptibility of two lymnaeid species. Parasitology Research 85: 212-215.

Toledo R., Muñoz-Antoli C., Esteban J. G. (2000): The life-cycle of *Echinostoma friedi* n.sp. (Trematoda: Echinostomatidae) in Spain and a discussion on the relationships within the 'revolutum' group based on cercarial chaetotaxy. *Systematic Parasitology* 45: 199–217.

Upatham E. S., Sturrock. R. F. (1973): Field investigations on the effect of other aquatic animals on the infection of *Biomphalaria glabrata* by *Schistosoma mansoni* miracidia. *Journal of Parasitology* 59: 448-453.

Volf P., Horák P., Čepička I., Flegr J., Lukeš J., Mikeš L., Svobodová M., Vávra J., Votýpka J. (2007): Paraziti a jejich biologie. Triton, Praha.

Whittington I. D. (1997): Reproduction and host-location among the parasitic Platyhelminthes. *International Journal for Parasitology* 27: 705-714.

Wilson R. A., Pullin R., Denison J. (1971): An investigation of the mechanism of infection by digenetic trematodes: the penetration of the miracidium of *Fasciola hepatica* into its snail host *Lymnaea truncatula*. *Parasitology* 63: 491-506.